

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-008684

(43)Date of publication of application : 16.01.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C12Q 1/68
 //(C12N 15/09
 C12R 1:85)
 (C12Q 1/68
 C12R 1:85)

(21)Application number : 11-179308

(71)Applicant : ASAHI BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 25.06.1999

(72)Inventor : YAMAGISHI HIROMI
 OGATA TOMOO

(54) NEW OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DIFFERENTIATING YEASTS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new base sequence which contains a specific base sequence, is in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for differentiating and/or identifying beer yeasts and so on.

SOLUTION: This is a new base sequence which contains at least a part of the base sequence shown by the formula, is in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for more in detail differentiating and/or identifying beer yeasts as a primer for the PCR method and for the production and/or quality control of beer and so on.

Cleavage patterns of a PCR product of a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA by a restriction enzyme are different between bottom fermenting beer yeasts *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*, so that the gene sequence allows differentiating bottom fermenting beer yeasts.

1. A new oligonucleotide having a base sequence represented by the formula (1) or (2), which is located in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for differentiating and/or identifying beer yeasts and so on.

2. A method for differentiating and/or identifying beer yeasts, comprising the steps of: (a) amplifying a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1 by a PCR method using the oligonucleotide of claim 1 as a primer; and (b) analyzing the amplified product by a restriction enzyme.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.06.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-8684

(P2001-8684A)

(43) 公開日 平成13年1月16日 (2001.1.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:85)			
(C 1 2 Q 1/68			

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-179308

(22) 出願日 平成11年6月25日 (1999.6.25)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 山岸 裕美

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 尾形 智夫

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ

ール株式会社東京工場内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

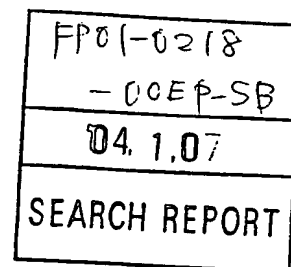
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規オリゴヌクレオチドとそれを用いた酵母分類法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、下面発酵ビール酵母を分類するのに利用可能なオリゴヌクレオチド及びそれを利用した下面発酵ビール酵母の分類方法を提供する。

【解決手段】下面発酵ビール酵母及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) の26 S r R N A をコードする遺伝子と5 S r R N A をコードする遺伝子との間のスベーター領域の遺伝子を明らかにし、この遺伝子配列の全部または一部を用いて、下面発酵ビール酵母を分類した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BFD1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項2】 配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母ID02003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項3】 配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項4】 配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*) タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項5】 配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*) タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項6】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 請求項1から5に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは請求項6あるいは7に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって酵母を分類する方法。

【請求項9】 請求項8記載の遺伝子増幅処理により得られた遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母を分類するのに利

用可能な遺伝子及びそれを利用した酵母の分類方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、酵母の染色体構造の解析と酵母の分類法について各種の報告がある。例えば、J GEN APPL MICROBIOL, VOL. 41, NO. 3, 239-247, 1995には、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、下面発酵ビール酵母について電気泳動的核型を検討し、その結果から下面発酵ビール酵母がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが記載されている。また、日本農芸化学1998年大会要旨集13ページ、2A7p24には、パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーションにより下面発酵ビール酵母の染色体構造を検討した結果、下面発酵ビール酵母はサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが報告されている。一方、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993には、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)の3種の酵母について、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のPCR産物の制限酵素断片長を比較している。さらに、本発明者らは、特開平11-56366「酵母を同定する方法」にて、rDNAの一部のPCR産物及び制限酵素断片長多型性とを組み合わせたビール醸造用酵母と非醸造用酵母を分類同定する方法を開示している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 これらの従来技術をもとに、検討する酵母がサッカロマイセス(*Saccharomyces*)属のどの種に該当するのか確認したり、ビール醸造用酵母と非醸造用酵母の分類を行うことは可能である。しかしながら、今日では、さらにビール醸造用の下面発酵ビール酵母においても、できるだけ個々の酵母に対する細やかな分類が望まれており、その課題については従来の報告内容ではその要望は達成が困難である。そこで、本発明では、下面発酵ビール酵母におけるより詳細な分類・同定に利用できる方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、下面発酵ビール酵母各株の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域を含むDNAの塩基配列を決定し、この塩基配列よりプライマーを作

製し、当該DNAをPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、下面発酵ビール酵母を分類・同定できることを見だし、本発明を完成させた。

【0005】従って、(1)第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。(2)第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母IFO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(3)第3の発明は、配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(4)第4の発明は、配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(5)第5の発明は、配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(6)第6の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(7)第7の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(8)第8の発明は、上記(1)から(5)に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは上記(6)及び(7)に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、

核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって下面発酵ビール酵母を分類する方法である。

(9)第9の発明は、上記第8の発明において得られる遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法である。

【0006】本発明で実施する遺伝子増幅に関する技術は既に公知である。本技術は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応であり、迅速・高感度で高い特異性を持ちかつ簡便であることから現在広い分野で利用されている。本発明においても、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Science 230,135 0,1985)を参考にして実施することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の概要を説明する。

(1)まず、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域のPCR産物について制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンを比較する。制限酵素には、MspI、SrfIを利用できる。MspIとSrfIを制限酵素として利用した場合、その切断パターンから下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。

(2)次に、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の塩基配列を決定する。塩基配列の決定方法は、公知の4000L Long ReadIR(登録商標)DNA Sequencing System(LI-COR社製)の方法を利用することができる。得られた塩基配列の相同性を比較検討し、異なる塩基配列部分を確認する。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)及びサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)との相同性を検討すると、下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。配列の違う部分は、配列番号1の101番目から1157番目、配列番号2の101番目から1154番目、配列番号3の101番目から1112番目、配列番号4の101番目から1113番目、配列番号5の101番目から1112番目である。

【0008】(3)(2)で決定した配列のうち、同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーを設計し、合成する。合成方法は既知の方法で実施できる。プライマーとなる塩基配列は、配列番号6及び7に示したものは一例であり、これに限定されるものではない。

(4)同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーとそれらプライマー

に組み合わせて共通して使用するプライマーを用いた。組み合わせて共通して使用するプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。但し、このプライマーはこのものに限定されるものではなく、26S rRNAをコードする塩基配列のものであればかまわない。これらプライマーを用いて、検討する下面発酵ビール酵母の遺伝子をPCR法で増幅させ、どちらの分類に属するかを決定する。(1)の方法はrDNAスベーター領域の一部をPCRにより増幅させ、その増幅産物を制限酵素で切断してハターンを比較する方法で、下面発酵ビール酵母を分類することができるが2段階の試験を必要とする。しかし、本方法はrDNAスベーター領域の下面発酵ビール酵母間で確実に差異のある部分をPCR法で増幅させて増幅の有無により分類するという簡単で確実な方法である。また、実施例以外のビール酵母にも十分応用可能な方法と考えられる。

(5)(4)の分類方法とは別の方法として、サザンハイブリダイゼーションによる分類方法がある。すなわち、(4)で増幅した産物をプローブとして、下面発酵ビール酵母のDNAに作用させてサザンハイブリダイゼーションを行い、どちらの分類に属するかを決定する。

【0009】本発明の配列表について説明する。配列番号1は、配列の長さが1432、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母BF1の配列である。配列番号2は、配列の長さが1429、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。

【0010】配列番号3は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。配列番号4は、配列の長さが1387、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538の配列である。配列番号5は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380の配列である。

【0011】配列番号6は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。配列番号7は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。

【0012】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。
実施例1

下面発酵ビール酵母のrDNAスベーター領域のPCR産物の制限酵素切断パターンの比較

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380、及びサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)X2180-1Aを試験に用いた。

【0013】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法(Gene 57267-272(1987))に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq(登録商標、宝酒造)を用いてプロトコール通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、先行文献[FEMSマイクロバイオリソロジー・レター(FEMS Microbiology Letters)]に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー(株)に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その後、この増幅産物の一部を取り、制限酵素MspI(TAKARA)またはSbfI(東洋紡社)により、37℃、60分間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、制限酵素切断パターンを比較した。

【0014】その結果を図1に示した。図1からも明らかなように、下面発酵ビール酵母は、2つのタイプに分類されることの確認された。グループ1には、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012が属し、グループ2には、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538が属していた。

【0015】実施例2

下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の塩基配列を決定した。

【0016】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法 (Gen 57267-272(1987)) に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq (登録商標、宝酒造) を用いてプライマール通りに反応溶液を調整した。プライマールの合成は、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108,259-264,1993に記載のプライマール配列を用いて、サワディーテクノロジー (株) に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマールのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。但し、使用したプライマールはこれに限定されず、5SrRNA及び26SrRNAをコードする塩基配列のものでかまわない。PCR終了後の増幅DNA 500ngを、TAKAクローニングキット (INVITROGEN社) に含まれるプラスミドPCR2.1を2 μ l、リガーゼを1 μ l、バッファーを1 μ l、滅菌水を全量10 μ lになるように加え、16℃、一晩反応させた後、その2 μ lと0.5Mメルカプトエタノール2 μ lをともに大腸菌INV α 'Fコンピテントセルに加え、水中、30分間放置したのち、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% Trytone, 0.5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂·6H₂O, 20mM glucose) 250 μ lを加え、37℃、60分間振とうした後、50 μ g/mlアンピシリン及び40 μ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晩培養した。現れた白色のコロニーを50 μ g/mlアンピシリンを含む2mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晩培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QUIAGEN社) を用いてプラスミド抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI (宝酒造社) により37℃、60分間反応させた後、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイドの染色により、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域が挿入さ

れていることを確認した。

【0017】このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応をおこなった。シーケンスプライマーはIRD11 Infrared Dye Labeled m13 Forwardプライマー及びIRD41 Infrared Dye Labeled m13 Reverseプライマー (日清紡社製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle SEQUENCING Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR社製) を用いた。

【0018】その結果、得られた各下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域塩基配列を配列表に記載した。

【0019】配列番号1は、下面発酵ビール酵母BF1の塩基配列を示す。配列番号2は、下面発酵ビール酵母IFO2003の塩基配列を示す。配列番号3は、下面発酵ビール酵母CBS1513の塩基配列を示す。配列番号4は、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の塩基配列を示す。配列番号5は、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380の塩基配列を示す。

【0020】実施例3

プライマールの合成

実施例2の塩基配列の相同性を比較した結果、塩基配列上からも下面発酵ビール酵母は、下面発酵ビール酵母BF1と下面発酵ビール酵母IFO2003のグループと、下面発酵ビール酵母CBS1513とサッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538のグループに分類されることが確認された。そこで、その差異が確認された部分を参考に、PCRの増幅用にプライマールを設計し合成した。

【0021】配列番号1をもとに、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング (株)) を用いて下面発酵ビール酵母BF1を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1の下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の1021番目から1050番目までの配列を選定した。プライマールの合成は、サワディーテクノロジー (株) に委託した。合成したプライマール①のオリゴヌクレオチド配列を配列番号6に示す。

【0022】また、同様の解析により、配列番号3をもとに、下面発酵ビール酵母CBS1513を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号3の下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の971番目から

1000番目までの配列を選定した。このオリゴヌクレオチドを実施例1と同様の方法で化学合成した。合成したプライマー②のオリゴヌクレオチド配列を配列番号7に示す。また、両プライマーを組み合わせて利用するプライマーとしては、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993の中に報告されているETS2プライマーを利用することとし、前記合成法と同様に合成した。合成したプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。

【0023】実施例4

プライマーの違いによるPCR増幅産物に基づく下面発酵ビール酵母の分類

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) X2180-1A、上面発酵ビール酵母TF1、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380を試験に用いた。

【0024】上記酵母より、実施例1と同様にDNAを抽出し、上記合成プライマー①及び③を用いてPCRを行った。PCRは実施例1と同様に行った。PCR反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対

移動度から求めた。その結果、図2Aに示されるように、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母IFO2003 (レーン1、5、6)にのみ約1100bpのバンドが検出された。同様に、上記合成プライマー②及び③を用いてPCRを行い、増幅産物の塩基長を調べたところ、図2Bに示されるように、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、(レーン7、9)にのみ約1000bpのバンドが検出された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、下面発酵ビール酵母BF1、CBS1513、IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) タイプ・ストレインCBS380の、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子が明らかになり、この遺伝子配列の全部または一部を用いた、下面発酵ビール酵母を分類する方法が提供された。そして、それらのスペーサー領域を本発明のプライマーを用いて、PCR法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、より詳細な下面発酵ビール酵母の分類、同定が可能となり、ビールの製造や品質管理に大きな貢献をするものと期待できる。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) Asahi Breweries, Ltd

(120) Novel oligonucleotide for differentiation of yeasts and a differentiation method using them.

(130) 9873-29

(160) 9

(210) 1

(211) 1432

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast BF1

(400) 1

```
caactgtagt taagctgcta agagcctgac cgastagtgt agtgggtgac catacgcgaa 60
acacagglgc tgcacatctt atttcttttt tttttttt tttttttt tctagtttct 120
tggtcttcta tgcataatcc cataactaac ctaccatleg attcagaaaa attcgcacta 180
tccagctgca ctcttcttct gaagagttaa gcactccatt atgctcattg ggttgcact 240
acttgataig tacaacaat atttctctcc galatttcta caaaaaaaaa aaacacctcc 300
ggttttgltc tcttctctcc atttctctct ctctctaggt taactcttcc ccttctgct 360
ttttctacac cctcttttag ttcttctttt tcttctctcc ctctctgca ctaacatttt 420
gcgcagtlac actatacgtat cgtagtlacat cttaaacctc cgcataccgc gtcgcacaaa 480
atttacttgc caaaccttcc catacttgtt aagtatacat gatatataat tgcactgget 540
attcatcttg caattttctt ctcttcttct cccagtagcc tctctctttt acgtgcctc 600
tctgcaactt gccatcata tctcttagaa actgcaattt acttaaaaaa aaatgctccc 660
caactgtcac tgttactgtt tcaactgtct cttaacatct tcttggtaaa atcgtagttc 720
```

glaglallll llllcalalc aaagcalgl eelglhael alaggaaalg agellllle 780
aattctetaa acttataaaa gaacteatgt ttgcegetet gatgatggg aaaaaactgc 840
lccalgaage aaacglcgg ggcacalccl llaegeleg ggaagelleg lgaagcccl 900
lclcllllta cccalccllg caacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa gaaaalaaa 960
aataaaaaga ccaaatagta aatgstacac tcttacacac tateatectc ategtatatt 1020
ataatagata tatacaatac atgtttttac ccgataata gatttcttaa gacaaataaa 1080
alllalagag accllgllcag lclaellele lclaaaelag gcccgggele clgecaglac 1140
ccaettagaa agaaataaaa aaacaaatca gacacaaag gettaatectc ascagatcgt 1200
aacaacaagg ctactctact gcttacaata cccgttcta catetaagtc gtatacaaat 1260
galllalecc caacgaaaal gacallgcaa llegecagea agcaccraag gccllleccg 1320
caagtgcacc gtgctagcc tctataggtt cagcgaccc acaaggacgc ettattcgta 1380
tccatetata ttgtgtgag caaagaaate acccggttct acatgaatt ct 1432

(210) 2

(211) 1429

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast IF02003

(400) 2

caacglagl laagclggla agagcclgac cgaglaglgl aglgggtgac catacgcgaa 60
acacagglgc tgaactclll allclllll lllllllll lllllllll claglllell 120
gacttctat gctaaatccc ataaetaacc taccattcga ttccagaaaa ttgcactat 180
ccagclgcac lclclleclg aagagllaag caclccatla lgcclallgg gllgclacta 240
cllgalaigl acaacaata lclccclcg alallccclac aaaaaaaaa acaccccggl 300
tttattctet tccctccatt tccctctctt ctacggttaa tctttccccc ttctctttt 360
tctacacct cgtttagtgt cttcttttct cttcccgctt tctgcaata acattttgc 420
gcaglacael alacgalegl aglacatcll acaacccgc alaccgcgcl gccaaaaall 480
lacllccca accalccal atclgllaag lalacatgla lalalallgc acggclatl 540
cclcllgac lllclclll lclcllccc aglaccclca lcllllaag clgcclclcl 600
gcaacttgc atcactatc cctagaaact gccatttact taaaaaaaa atgtccccc 660
tllcactgl lcaclglca cllgclclll acalcclll lgglaaaale glagllcgla 720
glallllll ccalatcaaa ggcclgclct glaaclala ggaaalgagc lllclcaat 780
tctctaaact tataaaagca ttcatgtttg ccctctgat ggtgcgaaa aaactgcctc 840
atgaagcaaa ctgtccgggc aaatccctt acctccgga agctctctga aagccctct 900
cllllaacc alclllgcaa cgaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaagaa aalaaaaal 960
aaaaagacca aatagtaaat gtacactct tacacactat cactcctate gtatattata 1020
atagatatat acaacacatg tttttaccg gatcatagag ttcttaagac aaataaaatt 1080
lalagagael lglcagcll acclclclcl aaactagcc ccgclccclg ccaglaccca 1140
cttagaanga aataaaaaa caaatcagac aacaaagct taatctcage agatcgtac 1200
aacaaggcta ctctactgt tacaataccc cgttgtacat ctaagtctga tacaatgat 1260
llalccccc gccaaalgac allgcaallc gccagcaagc acccaagcc lllccgcaaa 1320
gtgcaccgll gctagccclg lalggllcag cgaagccaca aggaagcccl allcglatcc 1380
atctatattg tgtgagcaa agaaatcacc gcgttctagc atgattct 1429

(210) 3

(211) 1386

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast CBS1513

(400) 3

caactgtagt taagctgga agagcctgac cgagtatgt agtgggtgac catacgcgaa 60
acacagglgc tgaactclll alalllllll llllgclall cclclalacg tacaattcac 120
glglaacgla ccallcgall cagaaaaacc cglactalcc agctgcactc lllclclaaa 180

gagelalgea caacacglge allglullac lgeilgalgl glaellgell allellaecel 240
 tteteeteeg atatteette ceeteeggt tttttttttt ettgttttte ttetecacat 300
 aegglilacl ellegleell ltelaceege legllcaall eellallall eellilegel 360
 lleeelllga aalaceege aclaacalll ceegcalace elalalalcl leglacaccl 420
 tacaaateeg aagaceeggt egacaaaaat caactette gatagectea tttettatat 480
 aggtagecat caettttttg tttttteegt gctatatat gtatatatgt ettettittt 540
 eelgelaaga gacccaacac lacllllllg elglalalac elaelcacac eglacelcaa 600
 aatecaaaage ctettecaet gtacacactt tactettaat egcttccat aactettagt 660
 ctettgtaa aatcgtagt tttagtattt ttttgteaa ggtacgece caagaatat 720
 agaagalgag gelllclcaa ltelacagag laalgeaage eelcalglll eeggelclca 780
 tggtccgaaa aaaaaagaa tgtttettaa actatactgt ceggaacaa ttttcegt 840
 cegstaaget ttgtaaaagc cettgtatat cagcgcgtct ttgcagcaga aacaaaaaag 900
 caaalcgaaa ggcaglcclc aaaaalaall ggaaacllag calcaccacc lglelelcaa 960
 gelglilacal aclaccaccl eegclacac ceagellac eeggalcala cagalellaa 1020
 gacaaataaa atttatagag acttggtcag teatactect ctetaaacta gsetcegggt 1080
 eelgceagla alageccael lagaaagaaa laaaaaacaa alacagacac aagggelaa 1140
 telcagcaga leglaacac aaggetaccl laelgelac aalaccccg lglacalcl 1200
 agtegtatac aaatgattta tccccagca aaatgacatt geatttccc agcaagcacc 1260
 caaggeclll cegcaaglg caccgtlgec agcelgelal ggtlcagcga cgcacaaag 1320
 acgecllall eglalccalc talgllglgl ggagcaaga aalcacceg lclagcalg 1380
 gattct 1386

(210) 4

(211) 1387

(212) DNA

(213) *Saccharomyces pastorianus* Type strain CBS1538

(400) 4

caaclglagl laagclggla agageclgac egaglaglgl aglggglgac calaccegaa 60
 actcaggtgc tgaatcttt atatttttt tttttctat teetctatac gtacaattca 120
 eglglaaegt accallegal lcagaaaaac eglacclalc cagclgcaccl ctlllccclaa 180
 agagclatgc acaacacglg callglltta elgelilalg lglacclgel lallcllacc 240
 tteteetece gatattctt ceeteeggt tttttttttt ttettgtttt tettegcaca 300
 ctacggttta ctettgtee tttttaccc gctcgttcaa ttcttatta ttcttttcc 360
 ctllclcllg aalcalccc geaclaacal lcccgcata cclalalal elleglacac 420
 ettacaaate cgaagaccgc gtgcacaaaa atcaacttct tgcagecct catttettat 480
 ataggtasec atactcttt tgttttttcc gtgctatat atgtatatat gtettettte 540
 lleeclgela gggacccaac aclacllll lgelglalal acclactcac accglaccl 600
 aaaatcaaaa gcctettcca ctgtacacac tttactetta atgccttcc ataactcttg 660
 ctctcttggt aaaatcgtag ttgtagtat ttttttggt aaggtacgc cccacgaact 720
 alagaagatg aggettlclc aallcllclag agtaalgcaa gccclcalgl lcccgcclcl 780
 calggclcca aaaaaaaga acgltttctt aaclalaccl gcccgggcaa actctttlcc 840
 tccgstaagc ttgtaaaag ccttgtata tcagcgcgc ttgcagcag aaacaaaaaa 900
 gcaaalcgaa aggcagclcl caaaaalaal lggaaclla gealcaccac clglelelca 960
 agclglilaca laclaccaccl accclacaaa cccagcllla cccggalcal acagalclla 1020
 agacaaataa aatttataga gaettgttca gtctactcc tetctaaact agsetceggc 1080
 lcelgceagl aalagcccac ltagaaagaa alaaaaaca aalcagacaa caaggcltla 1140
 alclcagcag aelglacaa caaggetacl clactgelia caalaccccg lltacaccl 1200
 aagtegtata caatgattt atccccagc aaaatgacat tgaattcgt cagcaagcac 1260
 ccaaggecll lccgcaagl geaccglgc tagcelgela lgttccagc agccacaaag 1320
 gacgecllat lclatccat clatghlglg lggagcaag aalcacccgc gtlclagcal 1380

ggatttct 1387

(210) 5

(211) 1386

(212) DNA

(213) *Saccharomyces bayanus* Type strain CBS380

(400) 5

caactgtagt taagctggta agagctgac cgagtagtgi agtgggtgac calacgegaa 60
actcaggtgc tgaattcttt atattttttt ttttctatt cctctatacg tacaattcac 120
gtataagta ccattegatt cagaaaaac ctaactatcc agctgcactc ttttctaaa 180
gagctatgca caacacgagc attgttttac tgcctgatgi glacttgctt attcttacct 240
ttctctctcg atattctctc cctctcggtt tttttttttt ctgttttttc ttgcacact 300
acgttttact ctctctctt ttctacccgc tcttcaatt ccttattatt cttttctgt 360
ttctttgaa atcaccgcgc actaacattt ccccatacc ctatatactt tcttaccct 420
tacaatcgc aagaccgcgt cagaaaaat caactcttc gctgcctca ttcttatal 480
aggtaccat cactcttttg tttttctgt gctatatat gtatatatgt cttctttctt 540
ctgtcaga gacccaacac tactttttg ctgtatata ctactcacac cgtaaccaa 600
aatcaaaagc ctcttccact glacacactt tactttaa cgtcttccat aactcttct 660
ctcttgtaa aatctgatt tctagtattt ttttgtaa ggtacccc caagaactat 720
agaagtag gcttttcaa ttctcagag taatgcagc cctcagttt cccgtctca 780
tggtccgaaa aaaaagaac tgtttcttaa actatactg cgggcacac tcttctcct 840
ccgttaact ttgtaaaagc cctgtatat cagcctgtt ttgcacaga aacaaaaag 900
caaatcgaaa ggcctgctc aaaaataat ggaacttag caccaccac tgtctctca 960
gtgtttact actaccacta cctctaac cagctttac cggatcata cagatctaa 1020
gacaaataa atttatagag acttctcag tctactct ctctaaacta gctcctgt 1080
ctgtcccta atagccact tagaaagaa taaaaaaa atcagacac aaggtctaa 1140
tctcagaga tcttacaac aagctactc tactgttac aatccccgt tctacata 1200
agctgtatc aaatgattt tccccagca aaatgactt gcaatctgc agcaagc 1260
caagctctt cgcctcagtg caccgttct agctgtctat ggtcagcga cgcacaagg 1320
acgtcttatt cgtatcact tatgttgtt gtagcaaga aatccccg ttctagctg 1380
gattct 1386

(210) 6

(211) 30

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A

(400) 6

tatatctatt ataataacg atgaggtga 30

(210) 7

(211) 30

(212) DNA

(213) *Saccharomyces bayanus* Type strain CBS380

(400) 7

(401)

ggtagtggtg gtagtgaac gcttgagaga 30

(210) 8

(211) 19

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A

(400) 8

caccgtttcc cgtccgat.

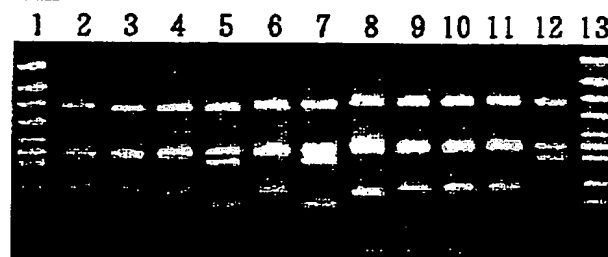
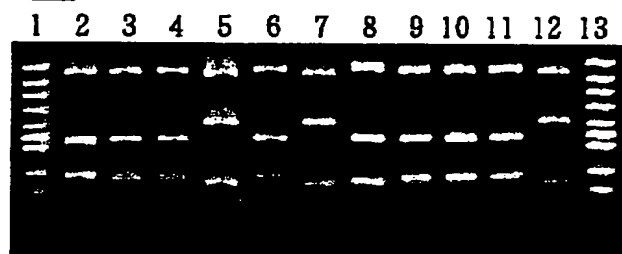
19

【図面の簡単な説明】

【図2】実施例4における電気泳動図。

【図1】実施例1における電気泳動図。

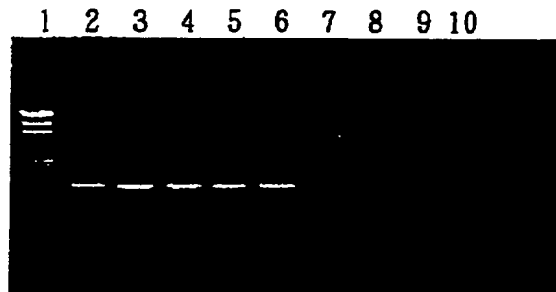
【図1】

A. Msp Iにより切断B. Srf Iにより切断

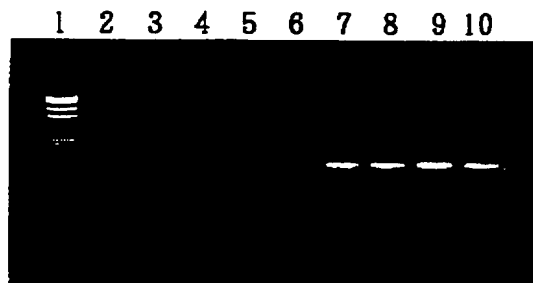
- レーン 1 : マーカール ϕ X174-HincII
 レーン 2 : サッカロマイセス・セレビスエ X2180-1A
 レーン 3 : 下面発酵ビール酵母BF1
 レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF2
 レーン 5 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
 レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
 レーン 7 : サッカロマイセス・パストリアヌス
 タイプ・ストレインCBS1538
 レーン 8 : 下面発酵ビール酵母ATCC10596
 レーン 9 : 下面発酵ビール酵母NCYC529
 レーン10 : 下面発酵ビール酵母NCYC1047
 レーン11 : 下面発酵ビール酵母IFO10012
 レーン12 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
 レーン13 : マーカール ϕ X174-HincII

【図2】

A. プライマー①及び③を用いた PCR



B. プライマー②及び③を用いた PCR



レーン 1 : マーカー λ -HindIII
レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
レーン 3 : 上面発酵ビール酵母TF1
レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF1
レーン 5 : 下面発酵ビール酵母BF2
レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
レーン 7 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
レーン 8 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
レーン 9 : サッカロマイセス・パストリアヌス
タイプ・ストレインCBS1538
レーン10 : サッカロマイセス・モナセンシス CBS 1503

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

識別記号

F I

キーワード(参考)

C 1 2 B 1:85)

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BAS0 CA09 CA11
DA06 EA04 FA18 GA30 HA12
4B063 QA13 QA18 QQ07 QQ54 QR35
QR40 QR55 QR62 QR76 QS25
QS34

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-8684

(P2001-8684A)

(43) 公開日 平成13年1月16日 (2001.1.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト ⁷ (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:85)			
(C 1 2 Q 1/68			

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-179308

(22) 出願日 平成11年6月25日 (1999.6.25)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 山岸 裕美

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ
ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 尾形 智夫

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ
ール株式会社東京工場内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規オリゴヌクレオチドとそれを用いた酵母分類法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、下面発酵ビール酵母を分類するのに利用可能なオリゴヌクレオチド及びそれを利用した下面発酵ビール酵母の分類方法を提供する。

【解決手段】下面発酵ビール酵母及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) の26 S r R N A をコードする遺伝子と5 S r R N A をコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子を明らかにし、この遺伝子配列の全部または一部を用いて、下面発酵ビール酵母を分類した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項2】 配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母IFO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項3】 配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項4】 配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*) タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項5】 配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*) タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項6】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 請求項1から5に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは請求項6あるいは7に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって酵母を分類する方法。

【請求項9】 請求項8記載の遺伝子増幅処理により得られた遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブライゼーションを行い、酵母を分類する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母を分類するのに利

用可能な遺伝子及びそれを利用した酵母の分類方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、酵母の染色体構造の解析と酵母の分類法について各種の報告がある。例えば、J GEN APPL MICROBIOL, VOL. 41, NO. 3, 239-247, 1995には、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、下面発酵ビール酵母について電気泳動的核型を検討し、その結果から下面発酵ビール酵母がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが記載されている。また、日本農芸化学1998年大会要旨集13ページ、2A7p24には、パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブライゼーションにより下面発酵ビール酵母の染色体構造を検討した結果、下面発酵ビール酵母はサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが報告されている。一方、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993には、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)の3種の酵母について、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のPCR産物の制限酵素断片長を比較している。さらに、本発明者らは、特開平11-56366「酵母を同定する方法」にて、rDNAの一部のPCR産物及び制限酵素断片長多型性とを組み合わせたビール醸造用酵母と非醸造用酵母を分類同定する方法を開示している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 これらの従来技術をもとに、検討する酵母がサッカロマイセス(*Saccharomyces*)属のどの種に該当するのか確認したり、ビール醸造用酵母と非醸造用酵母の分類を行うことは可能である。しかしながら、今日では、さらにビール醸造用の下面発酵ビール酵母においても、できるだけ個々の酵母に対する細やかな分類が望まれており、その課題については従来の報告内容ではその要望は達成が困難である。そこで、本発明では、下面発酵ビール酵母におけるより詳細な分類・同定に利用できる方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、下面発酵ビール酵母各株の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域を含むDNAの塩基配列を決定し、この塩基配列よりプライマーを作

製し、当該DNAをPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、下面発酵ビール酵母を分類・同定できることを見だし、本発明を完成させた。

【0005】従って、(1)第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。(2)第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母IFO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(3)第3の発明は、配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(4)第4の発明は、配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(5)第5の発明は、配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(6)第6の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(7)第7の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(8)第8の発明は、上記(1)から(5)に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは上記(6)及び(7)に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、

核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって下面発酵ビール酵母を分類する方法である。

(9)第9の発明は、上記第8の発明において得られる遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法である。

【0006】本発明で実施する遺伝子増幅に関する技術は既に公知である。本技術は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応であり、迅速・高感度で高い特異性を持ちかつ簡便であることから現在広い分野で利用されている。本発明においても、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す；Science 230,1350,1985)を参考にして実施することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の概要を説明する。

(1)まず、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域のPCR産物について制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンを比較する。制限酵素には、MspI、SrfIを利用できる。MspIとSrfIを制限酵素として利用した場合、その切断パターンから下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。

(2)次に、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の塩基配列を決定する。塩基配列の決定方法は、公知の4000L Long ReadIR(登録商標)DNA Sequencing System(LI-COR社製)の方法を利用することができる。得られた塩基配列の相同性を比較検討し、異なる塩基配列部分を確認する。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)及びサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)との相同性を検討すると、下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。配列の違う部分は、配列番号1の101番目から1157番目、配列番号2の101番目から1154番目、配列番号3の101番目から1112番目、配列番号4の101番目から1113番目、配列番号5の101番目から1112番目である。

【0008】(3)(2)で決定した配列のうち、同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーを設計し、合成する。合成方法は既知の方法で実施できる。プライマーとなる塩基配列は、配列番号6及び7に示したものは一例であり、これに限定されるものではない。

(4)同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーとそれらプライマー

に組み合わせて共通して使用するプライマーを用いた。組み合わせて共通して使用するプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。但し、このプライマーはこのものに限定されるものではなく、26S rRNAをコードする塩基配列のものであればかまわない。これらプライマーを用いて、検討する下面発酵ビール酵母の遺伝子をPCR法で増幅させ、どちらの分類に属するかを決定する。(1)の方法はrDNAスペーサー領域の一部をPCRにより増幅させ、その増幅産物を制限酵素で切断してパターンを比較する方法で、下面発酵ビール酵母を分類することができるが2段階の試験を必要とする。しかし、本方法はrDNAスペーサー領域の下面発酵ビール酵母間で確実に差異のある部分をPCR法で増幅させて増幅の有無により分類するという簡単で確実な方法である。また、実施例以外のビール酵母にも十分応用可能な方法と考えられる。

(5)(4)の分類方法とは別の方法として、サザンハイブリダイゼーションによる分類方法がある。すなわち、(4)で増幅した産物をプローブとして、下面発酵ビール酵母のDNAに作用させてサザンハイブリダイゼーションを行い、どちらの分類に属するかを決定する。

【0009】本発明の配列表について説明する。配列番号1は、配列の長さが1432、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母BF1の配列である。配列番号2は、配列の長さが1429、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。

【0010】配列番号3は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。配列番号4は、配列の長さが1387、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538の配列である。配列番号5は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380の配列である。

【0011】配列番号6は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。配列番号7は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。

【0012】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。実施例1

下面発酵ビール酵母のrDNAスペーサー領域のPCR産物の制限酵素切断パターンの比較

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380、及びサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)X2180-1Aを試験に用いた。

【0013】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法(Gene 57:267-272(1987))に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq(登録商標、宝酒造)を用いてプロトコール通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、先行文献[FEMSマイクロバイオリソロジーレター(FEMS Microbiology Letters)]に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー(株)に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その後、この増幅産物の一部を取り、制限酵素MspI(TAKARA)またはSclFI(東洋紡社)により、37℃、60分間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、制限酵素切断パターンを比較した。

【0014】その結果を図1に示した。図1からも明らかなように、下面発酵ビール酵母は、2つのタイプに分類されることの確認された。グループ1には、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012が属し、グループ2には、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538が属していた。

【0015】実施例2

下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の塩基配列を決定した。

【0016】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法 (Gene 57267-272(1987)) に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq (登録商標、宝酒造) を用いてプライマー通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108:259-264,1993に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー (株) に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。但し、使用したプライマーはこれに限定されず、5SrRNA及び26SrRNAをコードする塩基配列のものでかまわない。PCR終了後の増幅DNA 500ngを、TAクローニングキット (INVITROGEN社) に含まれるプラスミドpCR2.1を2 μ l、リガーゼを1 μ l、バッファーを1 μ l、滅菌水を全量10 μ lになるように加え、16℃、一晚反応させた後、その2 μ lと0.5Mメルカプトエタノール2 μ lをともに大腸菌INV α Fコンピテントセルに加え、水中、30分間放置したのち、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% Tryptone、0.5% Yeast Extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂·6H₂O、20mM glucose) 250 μ lを加え、37℃、60分間振とうした後、50 μ g/mlアンピシリン及び40 μ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50 μ g/mlアンピシリンを含む2mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QUAGEN社) を用いてプラスミド抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI (宝酒造社) により37℃、60分間反応させた後、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイドの染色により、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域が挿入さ

れていることを確認した。

【0017】このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応をおこなった。シーケンスプライマーはIRD11 Infared Dye Labeled m13 Forwardプライマー及びIRD41 Infared Dye Labeled m13 Reverseプライマー (日清紡社製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle SEQUENCING Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR社製) を用いた。

【0018】その結果、得られた各下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域塩基配列を配列表に記載した。

【0019】配列番号1は、下面発酵ビール酵母BF1の塩基配列を示す。配列番号2は、下面発酵ビール酵母IFO2003の塩基配列を示す。配列番号3は、下面発酵ビール酵母CBS1513の塩基配列を示す。配列番号4は、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の塩基配列を示す。配列番号5は、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380の塩基配列を示す。

【0020】実施例3

プライマーの合成

実施例2の塩基配列の相同性を比較した結果、塩基配列上からも下面発酵ビール酵母は、下面発酵ビール酵母BF1と下面発酵ビール酵母IFO2003のグループと、下面発酵ビール酵母CBS1513とサッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538のグループに分類されることが確認された。そこで、その差異が確認された部分を参考に、PCRの増幅用にプライマーを設計し合成した。

【0021】配列番号1をもとに、DNASIS (日立ソフトウェアリング (株)) を用いて下面発酵ビール酵母BF1を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1の下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の1021番目から1050番目までの配列を選定した。プライマーの合成は、サワディーテクノロジー (株) に委託した。合成したプライマー①のオリゴヌクレオチド配列を配列番号6に示す。

【0022】また、同様の解析により、配列番号3をもとに、下面発酵ビール酵母CBS1513を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号3の下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の971番目から

1000番目までの配列を選定した。このオリゴヌクレオチドを実施例1と同様の方法で化学合成した。合成したプライマー②のオリゴヌクレオチド配列を配列番号7に示す。また、両プライマーと組み合わせて利用するプライマーとしては、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993の中に報告されているETS2プライマーを利用することとし、前記合成法と同様に合成した。合成したプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。

【0023】実施例4

プライマーの違いによるPCR増幅産物に基づく下面発酵ビール酵母の分類

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)X2180-1A、上面発酵ビール酵母TF1、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380を試験に用いた。

【0024】上記酵母より、実施例1と同様にDNAを抽出し、上記合成プライマー①及び③を用いてPCRを行った。PCRは実施例1と同様に行った。PCR反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対

移動度から求めた。その結果、図2Aに示されるように、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母IFO2003(レーン4、5、6)にのみ約1100bpのバンドが検出された。同様に、上記合成プライマー②及び③を用いてPCRを行い、増幅産物の塩基長を調べたところ、図2Bに示されるように、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538、(レーン7、9)にのみ約1000bpのバンドが検出された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、下面発酵ビール酵母BF1、CBS1513、IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538、及びサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)タイプ・ストレインCBS380の、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子が明らかになり、この遺伝子配列の全部または一部を用いた、下面発酵ビール酵母を分類する方法が提供された。そして、それらのスペーサー領域を本発明のプライマーを用いて、PCR法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、より詳細な下面発酵ビール酵母の分類、同定が可能となり、ビールの製造や品質管理に大きな貢献をするものと期待できる。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) Asahi Breweries, Ltd

(120) Novel oligonucleotide for differentiation of yeasts and a differentiation method using them.

(130) 9873-29

(160) 9

(210) 1

(211) 1432

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast BF1

(400) 1

```
caactgtagt taagctgtag agagcctgac cgactagtgt agtgggtgac catacgcgaa 60
actcaggtgc tgcaatcttt attctctttt tttttttt tttttttt tctagtttct 120
tggtctccta tgcataatcc calaacaaac claccalleg attcagaaaa attgcaccta 180
tccagctgca ctctctctct gaagagttaa gcactccatt atgctcattg gtttgcact 240
actgalatg tacaacaat attctctcc galatccta caaaaaaaaa aaacacccc 300
ggcttctgct tctctctcc attctctct etttctcagg taactcttct ccttctgct 360
ttttctaac cctcttttag ttctctctt tctctctcc etttctgca ctacatttt 420
gcgcaglac actalacgat cgtaglacat cttaacaact cgcataccgc gtcgcaaaa 480
atttacttgc caaccatc calatctgtt aagtatacat glatatata tgcactggct 540
attcatcttg cacttttct etttctctt cccagtagcc tcatctttt acgtcgcct 600
tctgcaactt gccalcatc tccclagaa actgcaattt actlaaaaa aaatgccc 660
caactgtcac tgttcaactg tcaactgtct cttaactctt tcttggtaaa atcgtagctc 720
```

glaglatlll llllealale aaaggealgl eelglaacl alaggaaalg agellllele 780
aattetetaa aettataaaa geacteatst ttgeetetet gatagtscgs aaaaaactse 840
lecalgaage aaacglceeg ggcaaalcecl lleacgeleg ggaagellcg lgaagcecl 900
lelelllllaa cccalelllg caacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaalaaaa 960
aataaaaaa ccaaatagta aatgstacac tettaacac tateateete ategtatatt 1020
ataatagata tatacaatac atgtttttac eegsateata gatttettaa gacaaataaa 1080
alllalagag actllgllcag lelaelllele lelaaactag gecccgelele elgecaglac 1140
ccacttagaa agaaataaaa aaacaaatea gacacaaag gettaateete asacagatst 1200
aacaacaags ctactetaet gettacaata ccccgltgta catetaagte gtatacaaat 1260
galllalccc caacgaaaaal gacallgcaa lilegcagca agaccccaag geclllcege 1320
caagtacacc gttgetagcc tsetatggtt cagcagccce acaaggacge ettatttgta 1380
tccatetata ttgtatggag caaagaaate acccgattct acatggatt ct 1432

(210) 2

(211) 1429

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast IF02003

(400) 2

caacglagl laagclggla agagcelgac egaglagtgl aglggglgac calacgegaa 60
aalcaggtgc lgaalelll alllelllll llllllllll llllllllll elaglllell 120
gsetteetat getaaatecc ataactaacc taccattaga ttacagaaaa ttgcactat 180
ccagclgac lellellclg aagagllaag caclccalla lgclcatlgg gllgelacla 240
ellgalatgl acaacaala lletceleg alalteclac aaaaaaaaaa acaclecgg 300
tttgttetet teetecatt teetctettt ctacggttaa teettteccc ttgttett 360
tetacacct cgtttagtts etttttttt etteccgett teetgacta acattttgce 420
gcaglacael alacgalegl agtacalell acaaclecge alaccgegle gccaaaaall 480
lacllegcaa accallect alclgllaag lalacatgla lalalallge acllgelall 540
calcllgac lllleclll lelllelecc agtagelca lecllllaag elgeclelel 600
gcaacttgc atcactte cctagaaact gccatttact taaaaaaaa atgtccccc 660
lgllcaetgl laclgllea cllgteclll acalccllel lgglaaaale glagllccla 720
glalllllll calalcaaaa ggcattgcecl gtlacalala ggaaalgage lllleleaal 780
tetetaaact tataaaagea ttcatgtttg cegctetgat gttcggaana aaactgetce 840
atgaagcaaa ctgtccggge aaatctttt acgtccgga agcttcgtga aagccettet 900
cllllaacce alclllgcaa cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaa aataaaaaal 960
aaaaagacca aatagtaaat gttacactet tacacactat catectate gtatatata 1020
atagatatat acaacacatg tttttaccg gacatagag ttettaagac aaataaaatt 1080
lalagagael lgllcagtel accllelele aaclaggec ceggeleclg ccaglaccca 1140
cttagaaaga aataaaaaaa caaatcagac aacaaagget taatctcage agatctaac 1200
aacaaggeta ctetactget tacaataccc cgtttacat ctaagtegt tacaatgat 1260
llaleccac gcaaalgacl allgcaalle gccagcaage acccaaggec lllccgcaa 1320
glgcaccgtt gelagcelge lalggllcag cgacgcaca aggaagcecl allcglalce 1380
atctatattg ttgagacaa agaaatcacc scgttctage atgattct 1429

(210) 3

(211) 1386

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast CBS1513

(400) 3

caactgtagt taactgtgta agagcctgac egagtgtat agtggtgac catacgegaa 60
aalcaggtgc lgaalelll atattlllll llllgelall cclclalacg lacaaltcac 120
gtglaacgla ccallcgall cagaaaaacc cgtacalac agclgcacle lllleclaaa 180

gagelalgea caacacglge allgllllac lgeillgalgl glaelllgell attelllaeel 240
 tteteeteeg atattteette ceeteeggtt tttttttttt ttgtttttte tttegecaact 300
 aegglllael elllegleell llclaceege legllcaall cellallall celllllegel 360
 llcclllgaa alcaaceege acilaacall ceegcalace clalalalel leglacacel 420
 tacaateeg aagaceegst egacaaaaat caacttette gategeetea tttettatat 480
 aggtagecat caettttttg tttttteegt gsetatatat gtatatatgt ettettittt 540
 celgelaaga gacccaacac lacllllllg clglalalac clacleacac eglaaelcaa 600
 aatcaaaaage etettecaet gtacacaett tactettaat cseettecat aactettiget 660
 etettgtaa aatgtagtt tstagtattt ttttgsteaa gstaacece caagaactat 720
 agaagalgag gellllecaa llclacagag laalgeaage celcalglll cegeleleca 780
 tggteegaaa aaaaaaagaac tgtttettaa actatactgt ceeggaacac tettegecet 840
 ceegtaaget ttstaaaage cettgtatat cagcegetet ttseacaga aacaaaaaag 900
 caaalagaaa ggcagglele aaaaalaall ggaacellag calcaccace lgclelecaa 960
 gelglllael aclaccacaa cegeleaac ceagelllac ceggaleala cagalellaa 1020
 gacaaataaa atttatagag acttggteag teatactect ctetaaacta gsetceegst 1080
 celgecagla alageccael lagaagaaa laaaaaacaa alcagacac aagggellaa 1140
 lelacagaa leglaaacac aaggelacle laelgellac aalacecegt lglacalela 1200
 agtegtatac aaatgattta teccacgea aaatgacatt geaattegec acaagcace 1260
 caaggeelll cegecaaglg caecgllgel ageelgelal ggllcagaga cgecaaaag 1320
 aegcelalll eglalccale laiglllgll ggagcaaga aalcaceeg llclagecalg 1380
 gattet 1386

(210) 4

(211) 1387

(212) DNA

(213) *Saccharomyces pastorianus* Type strain CBS1538

(400) 4

caacglagl laagelggla agageclgac egaglaglgl aglggglgac calaegcgaa 60
 actcaggtge tgaatettt atattttttt tttttgetat teetctatac gtacaattca 120
 cglglaacgl accalllegat lcagaaaaac cglacale cagelgcaet ctllleclaa 180
 agagelalge acaacacglg callglllla clgelllaglg lglacllgel lalllellace 240
 tteteetece gatattceet ceeteeggt tttttttttt ttettgtttt tettegecaa 300
 ctacggttta ctettegtec tttttacec setegtteaa ttecttatta ttectttteg 360
 ctllleclllg aaalealccc gaclaacal llcegecala ceclalalal ctlllellac 420
 ettacaaate cgaagacege gtegaacaaa atcaacttet tsgategeet catttettat 480
 ataggtagec atcaetttt tgttttttce gtgsetatat atgtatatat gtettettte 540
 llcelgelaa gggacccaac aclaellll lgelglatal acclacleac accglaacle 600
 aaaaataaaa gceettteca ctgtacacac tttaetetta ategceette ataactettg 660
 ctctettigt aaaatgtag tttgtagtat tttttgste aagggtacec ccaacgaact 720
 alagaagalg aggellllel aalllellcag aglaalgcaa gceetcalgl llcegeclcl 780
 calggllcga aaaaaaaga acgllllell aaactatact gleeegggcaa acletttege 840
 teegstaage ttgtaaaag ceettgtata teagegegt tttgcagcag aacaaaaaaa 900
 gcaaalagaa aggecaglet caaaaaaal tggaaclla gealcaccac clgleleca 960
 agelglaca laclaccact accgelacaa ccagellla ceeggalcal acagalella 1020
 agacaaataa aatttataga gacttgttea gtatactec tetetaaact agsetcege 1080
 leelgecagl aalageccac ttagaaagaa alaaaaaca aalcagacaa caagggella 1140
 alclcagcag alegtacaa caaggelact claelgetla caataceceg llglacatcl 1200
 aagtegtata caaatgattt atcccacge aaatgacat tgaatttct cagaagcac 1260
 ccaaggeelll cegecaagt geacgllge lgeclgeta lggllcageg acgecaaaag 1320
 gaegeellat leglalecal clalglglg tggagcaag aalcacege gllclageat 1380

ggallct

1387

(210) 5

(211) 1386

(212) DNA

(213) *Saccharomyces bayanus* Type strain CBS380

(400) 5

caactgtagt laagelggta agagecagac egagtagtgi agtgggtagc calaagegaa 60
 acteaagtgc tgaatcttt atattttttt ttttgetatt cctetataag tacaattcac 120
 gtataacsta ccattcgatt cagaaaaac ccactatcc agctgcactc ttttctaaa 180
 gagclalga caacacgagc atlgllllac lgccllgatg glactlgcll attcllacc 240
 ttctctccg atattccttc cctccggtt tttttttttt cttgttttcc ttgcacac 300
 acgttttaet ctctgctctt ttctaccgc tegtccaatt ctttattatt ctttttcc 360
 ttcllllga alcaaccgc aclaacalll ccgcacacc clalalalcl tcllacaccl 420
 tacaacccg aagaccgcl cagaaaaal caactcltc gctgcclca ttclllalat 480
 agstaggcat caetctttt tttttccgt gctatatat gtatatatgt cttctttct 540
 cclgclaga gacccaacac tcllllllg clglalalac clactcacac cglacclca 600
 aalcaaaagc clcllccact glacacactl tclclllaal cccllccal aactcllcl 660
 ctcttggtta atctgtatgt tctagtattt ttttggtcaa ggtacgcgc caagaactat 720
 agaagtagg gclllclca ttcllccag laalgaagc cclcatgtll ccgcclclca 780
 tggclcgaaa aaaaagaac tglclcllaa aclalactgl ccgggcaaac tclllcccl 840
 ccgttaagct ttgtaaaagc cctgtatat cagcgcgtt ttgcacaga aacaaaaag 900
 caaalcgaaa ggcagcltc aaaaalaatl ggaactllag calcaccacc tglclclca 960
 gelglacal aclaccaccl ccglacac ccagctllac ccgclclca cagclclla 1020
 gacaaataa atttatagag acttggtcag tctactct ctctaaacta gctccgct 1080
 cctccagta atagccact tagaaagaa taaaaacaa atcagacac aaggcttaa 1140
 tclcagcaga tclgaacac aagclactc tclgcltac aalaccccl tglacalcl 1200
 agclglalac aalgtatla lcccaagca aalgcactl gcaatccgc agcaagcacc 1260
 caagcccll ccgcaaglg caccglclt agclclgat gcllccaga ccgcacaag 1320
 acccttatt cgtatccat tatgtgtgt ggcacaaag aatcccgct ttctagcat 1380
 gallct 1386

(210) 6

(211) 30

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A

(400) 6

tatatctatt ataataacg atgagatga

30

(210) 7

(211) 30

(212) DNA

(213) *Saccharomyces bayanus* Type strain CBS380

(400) 7

(401)

gtagtggtla gtaglaaca gcllgagaga

30

(210) 8

(211) 19

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A

(400) 8

caccgttcc cgtccgat.

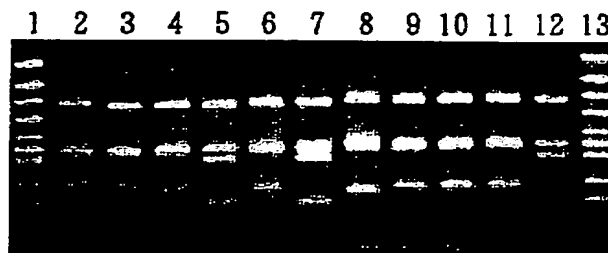
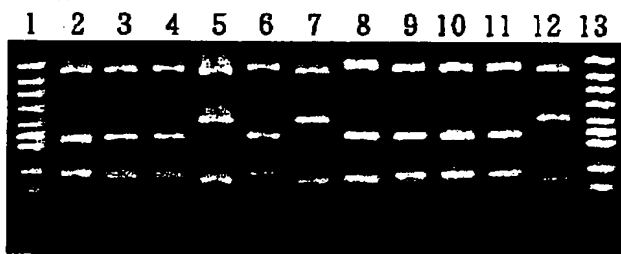
19

【図面の簡単な説明】

【図2】実施例4における電気泳動図。

【図1】実施例1における電気泳動図。

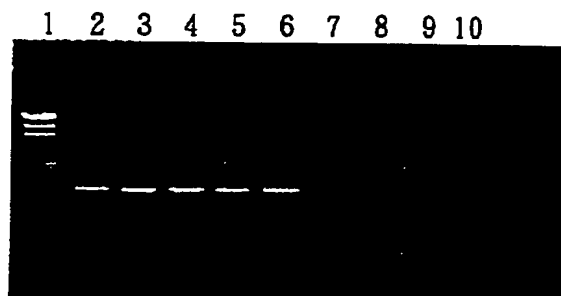
【図1】

A. Msp Iにより切断B. ScrFIにより切断

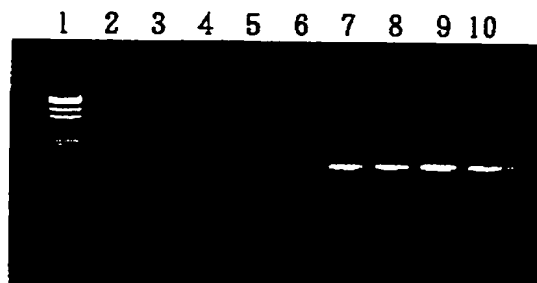
- レーン 1 : マーカール ϕ X174-HincII
 レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
 レーン 3 : 下面発酵ビール酵母BF1
 レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF2
 レーン 5 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
 レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
 レーン 7 : サッカロマイセス・パストリアヌス
 タイプ・ストレインCBS1538
 レーン 8 : 下面発酵ビール酵母ATCC10596
 レーン 9 : 下面発酵ビール酵母NCYC529
 レーン10 : 下面発酵ビール酵母NCYC1047
 レーン11 : 下面発酵ビール酵母IFO10012
 レーン12 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
 レーン13 : マーカール ϕ X174-HincII

【図2】

A. プライマー①及び③を用いた PCR



B. プライマー②及び③を用いた PCR



レーン 1 : マーカ λ -HindIII
レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
レーン 3 : 上面発酵ビール酵母TF1
レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF1
レーン 5 : 下面発酵ビール酵母BF2
レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
レーン 7 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
レーン 8 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
レーン 9 : サッカロマイセス・パストリアヌス
タイプ・ストレインCBS1538
レーン10 : サッカロマイセス・モナセンシス CBS 1503

フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

識別記号

F1

7-71-ド (参考)

C12R 1:85)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA09 CA11
DA06 EA04 FA18 GA30 HA12
4B063 QA13 QA18 QQ07 QQ54 QR35
QR40 QR55 QR62 QR76 QS25
QS34